

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-180998

(43)公開日 平成11年(1999)7月6日

(51) Int.Cl.⁶
 C 07 K 14/08
 G 01 N 33/569

識別記号

F I
 C 07 K 14/08
 G 01 N 33/569

L

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平9-354733

(22)出願日 平成9年(1997)12月24日

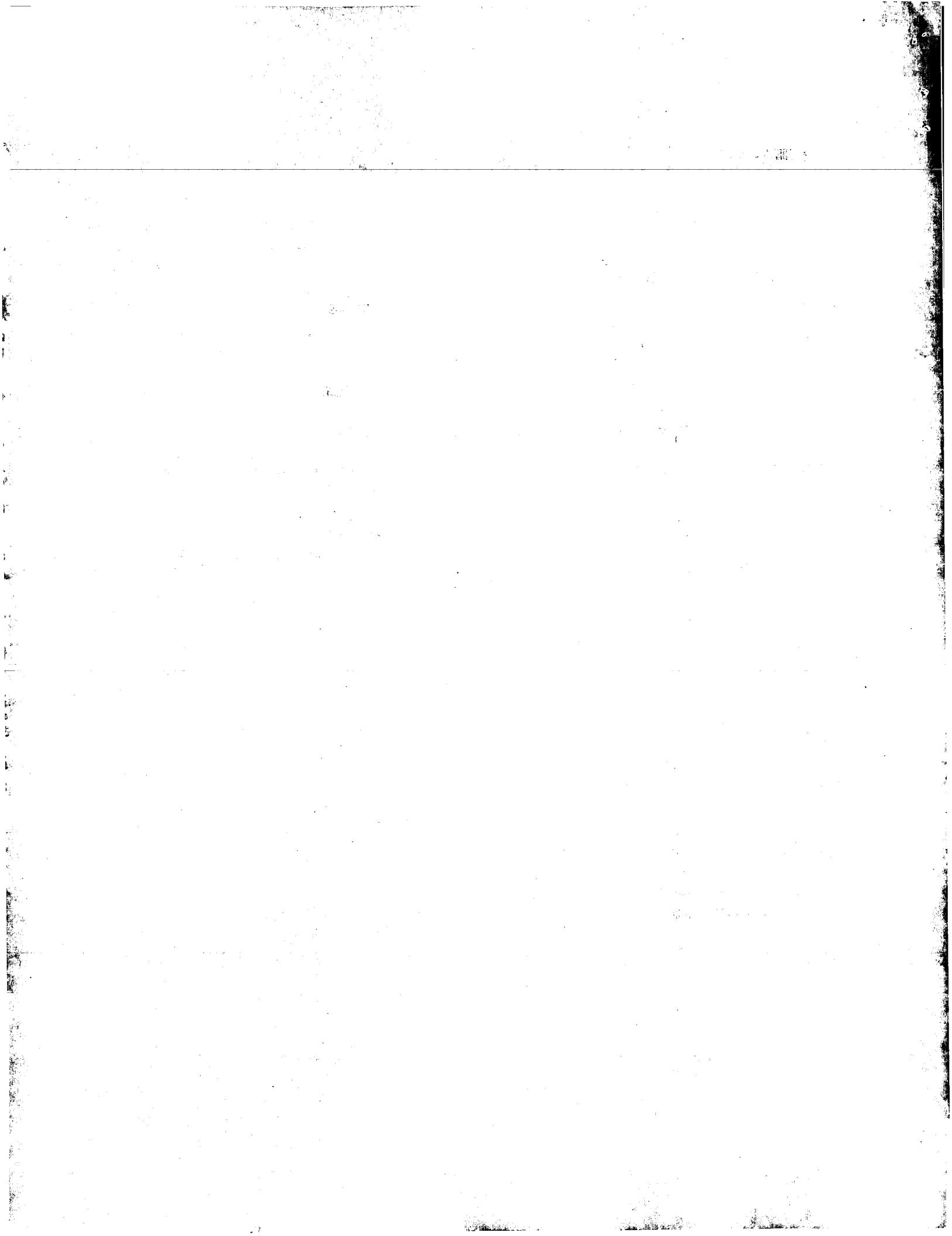
(71)出願人 000000217
 エーザイ株式会社
 東京都文京区小石川4丁目6番10号
 (72)発明者 山口 一成
 熊本県熊本市国府本町12-47
 (72)発明者 沢田 高志
 茨城県つくば市千現2-9-17

(54)【発明の名称】 ポルナ病ウイルス抗体検出用ポリペプチド

(57)【要約】

【課題】抗B D V抗体を測定するための特異性の高い抗原ペプチド、その測定方法および測定試薬を提供する。

【解決手段】B D Vの核蛋白(p40)の3-20、48-68、310-323および338-358番目のアミノ配列を有するポリペプチド、ポリメラーゼコファクター(p24)の41-55および59-79番目のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、抗B D V抗体に対して特異的な免疫反応を起こし、該抗体の検出に有用である。



1

【特許請求の範囲】

【請求項1】ボルナ病ウイルスの核蛋白 (p40) またはポリメラーゼコファクター (p24) を構成するポリペプチドであって、配列番号1～6に記載したアミノ酸配列を含むものからなるポリペプチドまたはそれらと実質的に同等なポリペプチド。

【請求項2】生体試料中のボルナ病ウイルスの核蛋白 (p40) および/またはポリメラーゼコファクター (p24) を構成するポリペプチドに対する抗体を検出する方法であって、(a) 生体試料と配列番号1～6に示したアミノ酸配列を含むものからなるポリペプチドまたはそれらと実質的に同等なポリペプチドの少なくとも1つを混合して、免疫反応物を生成させる過程、(b) 上記免疫反応物に標識を施す過程、(c) 標識物を測定する過程、からなるボルナ病ウイルス抗体の検出方法。

【請求項3】ボルナ病ウイルスの核蛋白 (p40) および/またはポリメラーゼコファクター (p24) を構成するポリペプチドであって、配列番号1～6に記載したアミノ酸配列を含むものからなるポリペプチドまたはそれらと実質的に同等なポリペプチドの少なくとも1つを構成成分とすることを特徴とするボルナ病ウイルス抗体の検出試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は人および動物用の感染症診断試薬に関する。さらに詳しくはボルナ病ウイルス抗体を検出するためのペプチド、その検出方法および検出に使用する試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】ボルナ病はドイツおよびその周辺諸国で、四季を通じてウマに発生するウイルス性脳脊髄炎である。脳性麻痺や情動障害等の症状を呈し、急性経過をたどると致死的である。病変は脳幹神経核、特に中脳に多く見られ、神経細胞核内にJoest-Degen小体という封入体が形成される。ボルナ病ウイルス (Borna Disease Virus、以下BDV) はBornaviridae科に属するウイルスで、ゲノムは約9kbの1本鎖、マイナス鎖のRNAウイルスであることが明らかになっている。BDVはウマ以外にもヒツジやウシ、ネコ、ダチョウなどに自然感染し、実験的にはマウスをはじめ鳥類からサルまでさらに広範囲に感染させることができる。ヒトにおいても血清学的検査によって、BDVに対する抗体保有者が確認されており (Rott, R. et al., *Science*, 228, 755-756, 1985)、特に分裂病やうつ病などの神経精神疾患患者で健常人よりも高率にみられるとの報告がなされ、注目を受けている。同ウイルスの全塩基配列はCubittら (Cubitt, B., et al., *J. Virol.*, 68, 1382-1396, 1994)、Brieselら (Briesel, T., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91, 4362-4366, 1994) によって報告されており、このウイルス遺伝子がコードする蛋白として、核蛋白 (p4

2

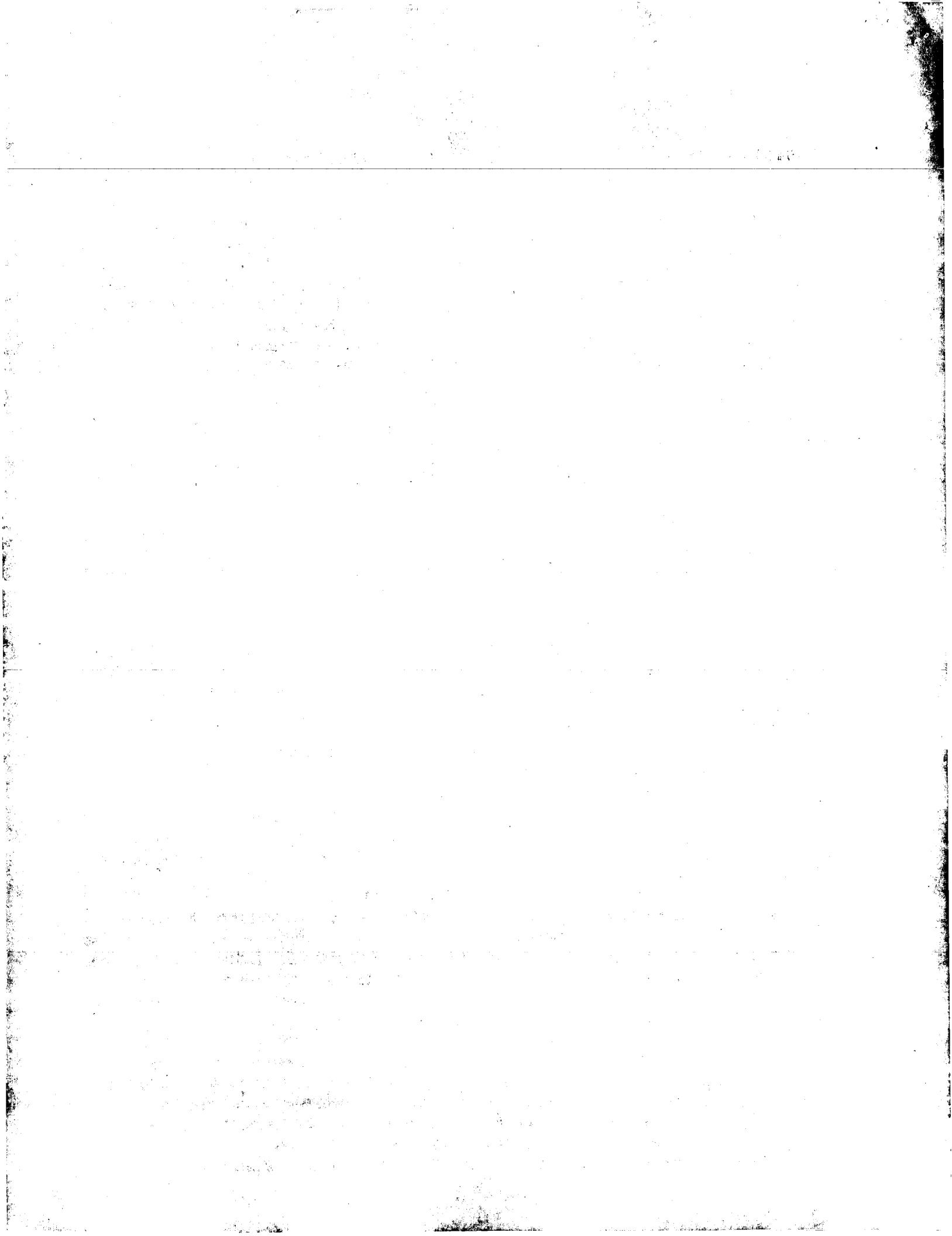
0)、ポリメラーゼコファクター (p24)、マトリックス (gp18)、エンベロープ (gp56)、ポリメラーゼ (p180) の各蛋白が知られている。BDV感染の診断法としては、血中に抗BDV抗体を検出する血清学的手法と、RT-PCR法によりBDVゲノムRNAを直接検出する遺伝子的手法が行われている。抗BDV抗体の検出法としては、間接蛍光抗体法 (Amsterdam, J. D., et al., *Arch. Gen. Psychiatry*, 42, 1093-1096, 1985) やウェスタンプロット法 (Fu, Z. F., et al., *J. Affect. Disord.*, 27, 61-68, 1993)、免疫沈降法 (Bode, L. et al., *J. Med. Virol.*, 36, 309-315, 1992)、ELISA法 (Weisman, Y., et al., *Lancet*, 344, 1232-1233, 1994)、患者末梢血中の単球を検体とするフローサイトメトリー法 (Bode, L. et al., *Nature Medicine*, 1, 232-236, 1995) などが用いられている。抗体の検出方法としては上記のような各種方法があるが、ヒトにおける抗BDV抗体価は概して非常に低く、特異的反応と非特異的反応の識別が困難なこと、また、使用する抗原によって結果が異なってくることから、信頼度の高い標準的な抗体測定法は未だ確立されていない。BDVのゲノムRNAを直接検出する方法としては、ヒトの末梢血液中の単核細胞からRT-PCR法によってウイルス遺伝子の断片を検出する方法が報告されている (Kishi, M., et al., *FEBS Lett.*, 364, 293-297, 1995)。ゲノムを直接検出する方法は確度の高い方法ではあるが、本来BDVは向神経性のウイルスであることから、必ずしも全ての感染者の末梢血単核細胞中にBDVゲノムRNAが検出されるわけではない。また、非常に高感度であるRT-PCR法には、常に相互汚染によって偽陽性反応を示す危険性がつきまとっており、信頼性と普遍性のあるデータの蓄積は成されていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、抗BDV抗体の検出にあたり、抗体に対して高い特異性を有する抗原ペプチドを提供し、また、その測定方法および測定試薬を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、BDVの核蛋白 (p40) およびポリメラーゼコファクター (p24) を構成するペプチドに着目し、p40の3-20、48-68、310-323および338-358番目のアミノ配列を有するポリペプチド、p24の41-55および59-79番目のアミノ酸配列を有するポリペプチドが、BDVに対する抗血清と特異的な免疫反応を起こすことを見出し本発明を完成了。すなわち本発明は、(1) ボルナ病ウイルスの核蛋白 (p40) またはポリメラーゼコファクター (p24) を構成するポリペプチドをコードする核酸配列であって、配列番号1～6に記載した配列を含むものからなるポリペプチドまたはそれらと実質的に同等なポリペプチド、(2) 該ポリペプチドを抗原として使用するボルナ病ウイルス抗体の検出方



法、(3)該ポリペプチドを構成成分とするボルナ病ウイルス抗体の検出試薬である。なお、配列番号1～6に記載した本発明ポリペプチドと実質的に同等なポリペプチドも本発明に含まれる。実質的に同等とはボルナ病ウイルス抗体と結合活性を有することを意味し、アミノ酸の欠失、置換、付加体が含まれる。

【0005】

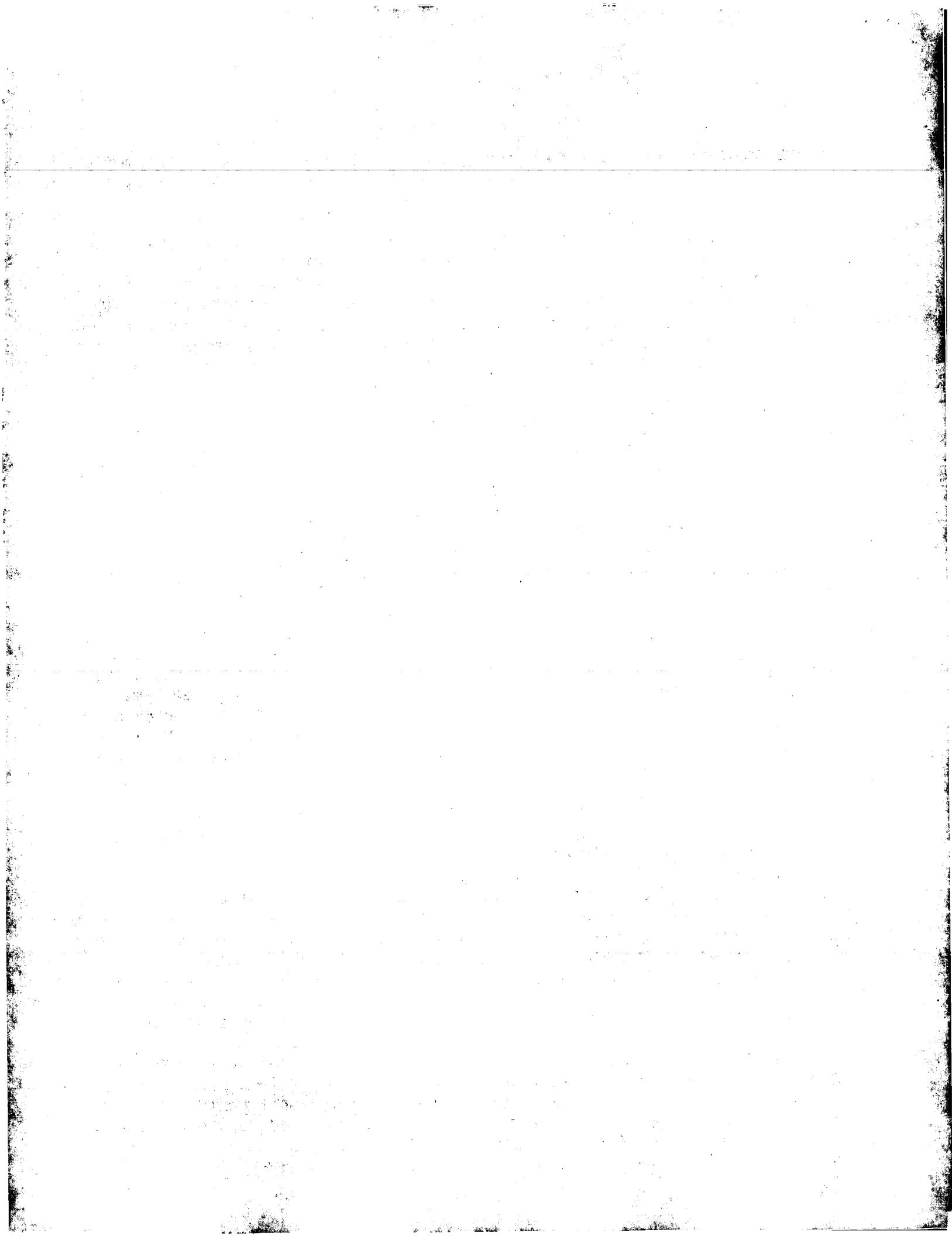
【発明の実施の形態】以下に本発明を詳細に説明する。本発明に係るペプチドを用いて、生体試料中の抗BDV p40抗体および/または抗BDV p24抗体の有無を免疫学的手法により検定することができ、該ウイルスの感染診断が可能である。生体試料としては、例えばヒトや動物の血清、血漿、脊髄液、リンパ液、唾液、漿液および細胞等が挙げられる。免疫学的手法としては公知の方法を適用すればよく、例えば電気化学発光免疫測定法、酵素免疫測定法、放射免疫測定法、ウェスタンプロット法、受け身粒子凝集法、受け身血球凝集法、ラテックス凝集法、化学発光免疫測定法などが挙げられる。以下に1例として電気化学発光免疫測定法による測定方法を記す。測定系の構成要素は、抗原ペプチドを固相化する担体、被験試料、標識用抗体、標識物質としての電気化学発光物質等である。抗原ペプチドの作製方法は特に限定されず、通常の化学合成、BDV感染細胞からの抽出、遺伝子組み替えした大腸菌等に発現させる等の方法があるが、特異性の高いペプチドを得ることができる合成法によることが好ましい。合成法としては例えば固相合成法等が挙げられる。また、担体へのペプチドの吸着を容易にするために、ペプチドの末端にシステインやリジン等のアミノ酸残基を付加しても差し支えない。ペプチドの固相化用担体としては、磁気感応性粒子、マイクロタイタープレート、プラスチックビーズ、赤血球、ゼラチン粒子、ポリアミノ酸粒子、ラテックス粒子、ナイロン膜、ニトロセルロース膜などいずれの担体も使用することができ、測定法に応じて適宜選択すればよい。電気化学発光法の場合には磁気粒子、ラテックス粒子等が好ましい。標識用抗体としては、ヒトIgG抗体、ヒトIgM抗体、ヒトIgA抗体などが用いられる。標識物質としての電気化学発光物質としては、ルテニウムートリスーピーピリジル、オスミウムートリスーピーピリジル、カドミウムートリスーピーピリジル、レニウムートリスーピーピリジル等が挙げられる。測定の手順は以下の通りである。抗原ペプチドを磁気感応性粒子に固相化し、検体試料とを反応させる。これを洗浄後、電気化学発光物質で標識した抗ヒトIgG抗体と反応させる。さらに洗浄後、磁気感応性粒子に電気エネルギーを加えて、電気化学発光物質からの発光量を測定する。本発明に係る測定試薬は、配列番号1～6に記載したポリペプチドの少なくとも1つを必須構成成分とし、標識用抗体、標準抗原、酵素および基質等からなる。該ペプチドと電気化学発光物質が同時に含まれる場合には両者が結合した状態であつ

てもよい。また、測定の都合により、適切な抗原希釈液、反応希釈液、洗浄液、発光補助液等が含まれていてもよい。

【0006】本発明に使用したリコンビナントBDV p40抗原蛋白およびリコンビナントBDV p24抗原蛋白は、常法の遺伝子組み替え手法により調製することができる。たとえば、p40 cDNA (Cubitt, B., et al., J. Virol., 68, 1382-1396, 1994) をプラスミドに組み込む。cDNAを組み込むプラスミドベクターとしてはpBluescript II SK、大腸菌由来のpBR322、pUC18、枯草菌由来のpsH15などが挙げられるが、これらは宿主細胞内に保持されて複製、增幅されるものであれば、いずれも使用することができる。この様にして得られたベクターは適切な宿主、たとえば大腸菌などに導入し、形質転換体を作製する。ベクターの宿主への導入法としては、たとえばコンピテント細胞法 (J. Mol. Biol., 53, 154, 1970)、プロトプラスト法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929, 1978)、リン酸カルシウム法 (Science, 221, 551, 1983)、インビトロパッケージング法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 581, 1975)、ウイルスベクター法 (Cell, 37, 1053, 1984) などが挙げられる。宿主となり得る大腸菌としては、たとえば *Escherichia coli* HB101、JM109などが挙げられる。cDNAのベクターがプラスミドの場合には、塩化カルシウム法、塩化カルシウム・塩化ルビジウム法を用いて宿主細胞に保持させることができる (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, p249, 1982)。そして、これら形質転換体を通常の培養方法で増殖させた後、培養物中からp40抗原蛋白を得ることができる (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982)。

【0007】
【実施例】以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。
実施例1 BDV合成ペプチドの作製
Cubittら (Cubitt, B., et al., J. Virol., 68, 1382-1396, 1994) が報告したBDVの核蛋白(p40)とポリメラーゼコファクター(p24)部位のアミノ酸配列から、Hopp-Woods法 (Hopp, T. P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 3824-3828, 1981) によって、親水性に富んだ部位を13カ所選択した(図1および2)。それぞれのアミノ酸配列について、固相合成法によりペプチドを合成し、逆相液体クロマトグラフィーを使用して純度が95%以上になるように精製した。

【0008】実施例2 BDV合成ペプチドのスクリーニング
リコンビナントBDV p40抗原またはリコンビナントBDV p24抗原をウサギに接種して、抗BDV p40血清、抗BDV p24血清をそれぞれ作製した。対照としては正常ウサギ血清を使用した。実施例1で合成した13種類のペ



5

ペプチドを、濃度100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように0.05Mホウ酸緩衝液(pH9.5)に溶解した。各ペプチド溶液1 ml に対して磁気感応性ビーズ(ダイナビーズM-450TM、ダイナール社製)30mgを加え、37°Cで一夜混和し、13種類のペプチド結合ビーズを作製した。反応管にニワトリ血清200 μl 、ウサギ抗血清20 μl および各ペプチド結合ビーズ(1 mg/ml)25 μl を加え、30°Cで9分間反応させた。ビーズを洗浄後、ルテニウム錯体で標識した抗ウサギIgG抗体液(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を200 μl 加え、30°Cで9分間反応させた。さらにビーズを洗浄後、発光電解液を250 μl 添加してから電気エネルギーを加え、ビーズにトラップされたルテニウム錯体からの発光量を専用の測定器(ピコルミ8220TM、三光純薬社製)で計測した。

その結果、No. 1、2、7およびNo. 8のペプチドが抗BDVp40ウサギ血清と特異的に反応し、No. 10および11のペプチドが抗BDVp24ウサギ血清と特異的に反応するペプチドであることが判明した(表1、2)。これらのペプチドのアミノ酸配列を、配列番号1 (No. 1)、2 (No. 2)、3 (No. 7)、4 (No. 8)、5 (No. 10)、6 (No. 11)にそれぞれ記載した。

【0009】

10 【表1】

表1 各種p40ペプチドと抗p40ウサギ血清との反応性

配列番号	アミノ酸番号	ECLIA カウント	
		正常ウサギ血清	抗p40ウサギ血清
1	3-20	253	266,239
2	48-68	423	116,369
3	119-132	379	9,592
4	152-167	165	1,014
5	214-226	202	561
6	261-277	291	1,861
7	310-323	275	49,038
8	338-358	109	236,197

【0010】

【表2】

表2 各種p24ペプチドと抗p24ウサギ血清との反応性

配列番号	アミノ酸番号	ECLIA カウント	
		正常ウサギ血清	抗p24ウサギ血清
9	11-35	264	736
10	41-55	166	35,288
11	59-79	182	78,833
12	82-97	257	1,286
13	140-160	223	871

【0011】

配列の型：アミノ酸

【配列表】

トポロジー：直鎖状

配列番号1

40 配列の種類：ペプチド

配列の長さ：18

配列

Pro	Lys	Arg	Arg	Leu	Val	Asp	Asp	Ala	Asp	Ala	Met	Glu	Asp	Gln	Asp
1				5							10				15

Leu Tyr

【0012】配列番号2

トポロジー：直鎖状

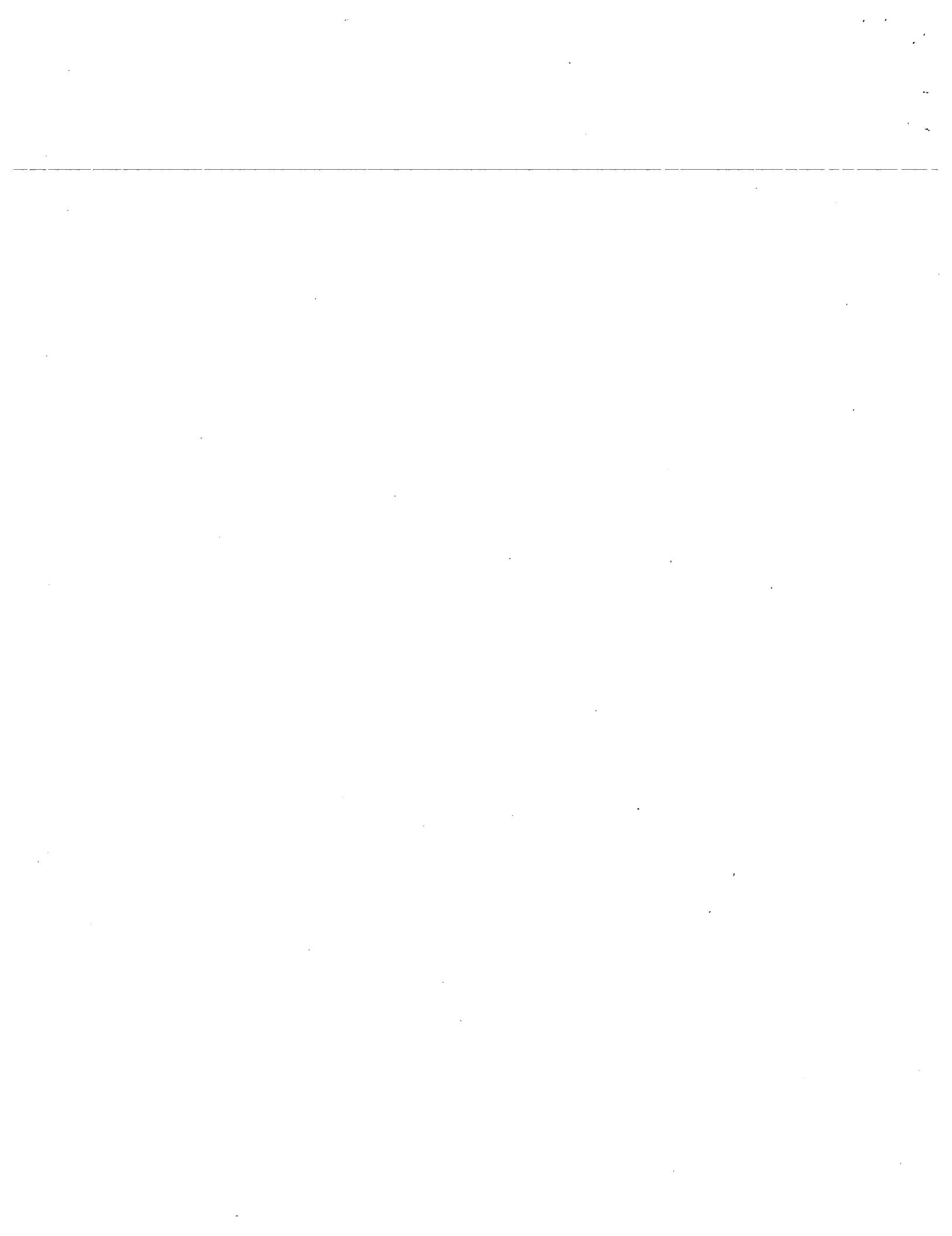
配列の長さ：21

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

配列

Gly	His	Glu	Lys	Asp	Ile	Arg	Gln	Asn	Ala	Val	Ala	Leu	Leu	Asp	Gln
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----



7
1 5
Ser Arg Arg Asp Met
20

【0013】配列番号3

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

配列

Ser Lys Lys Glu Asn Pro Thr Met Ala Gly Tyr Arg Ala Ser
1 5 10

【0014】配列番号4

配列の長さ：20

配列の型：アミノ酸

配列

Arg Tyr Arg Arg Arg Glu Ile Ser Arg Gly Glu Asp Gly Ala Glu Leu
1 5 10 15
Ser Gly Glu Ile
20

【0015】配列番号5

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

配列

Gln Pro Val Asp Gln Leu Leu Lys Asp Leu Arg Lys Asn Pro Ser
1 5 10 15

【0016】配列番号6

配列の長さ：21

配列の型：アミノ酸

配列

Asp Pro Asp Gln Arg Thr Gly Arg Glu Gln Leu Ser Asn Asp Glu Leu
1 5 10 15
Ile Lys Lys Leu Val
20

【0017】

【図面の簡単な説明】

【図1】BDVの核蛋白(p40)アミノ酸配列の親水性パターンと合成したペプチドの部位を示した図である。

【図1】

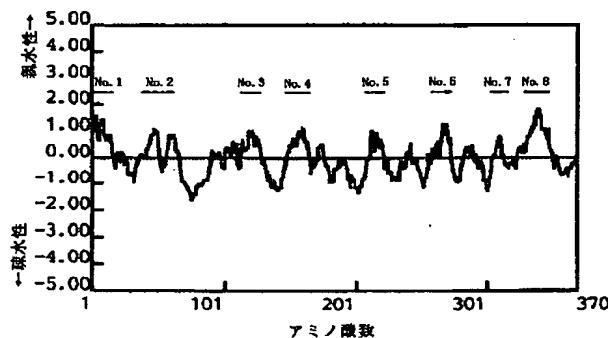


図1. p40 アミノ酸配列の親水性パターンと合成したペプチドの部位 (No. 1~8)

【図2】

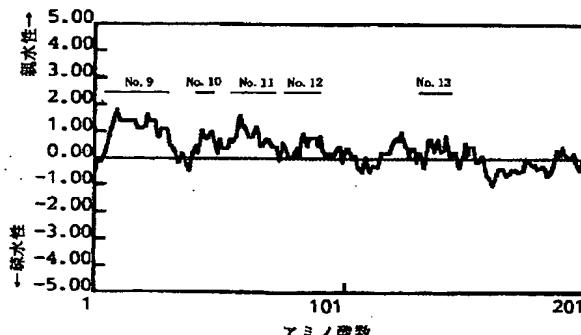
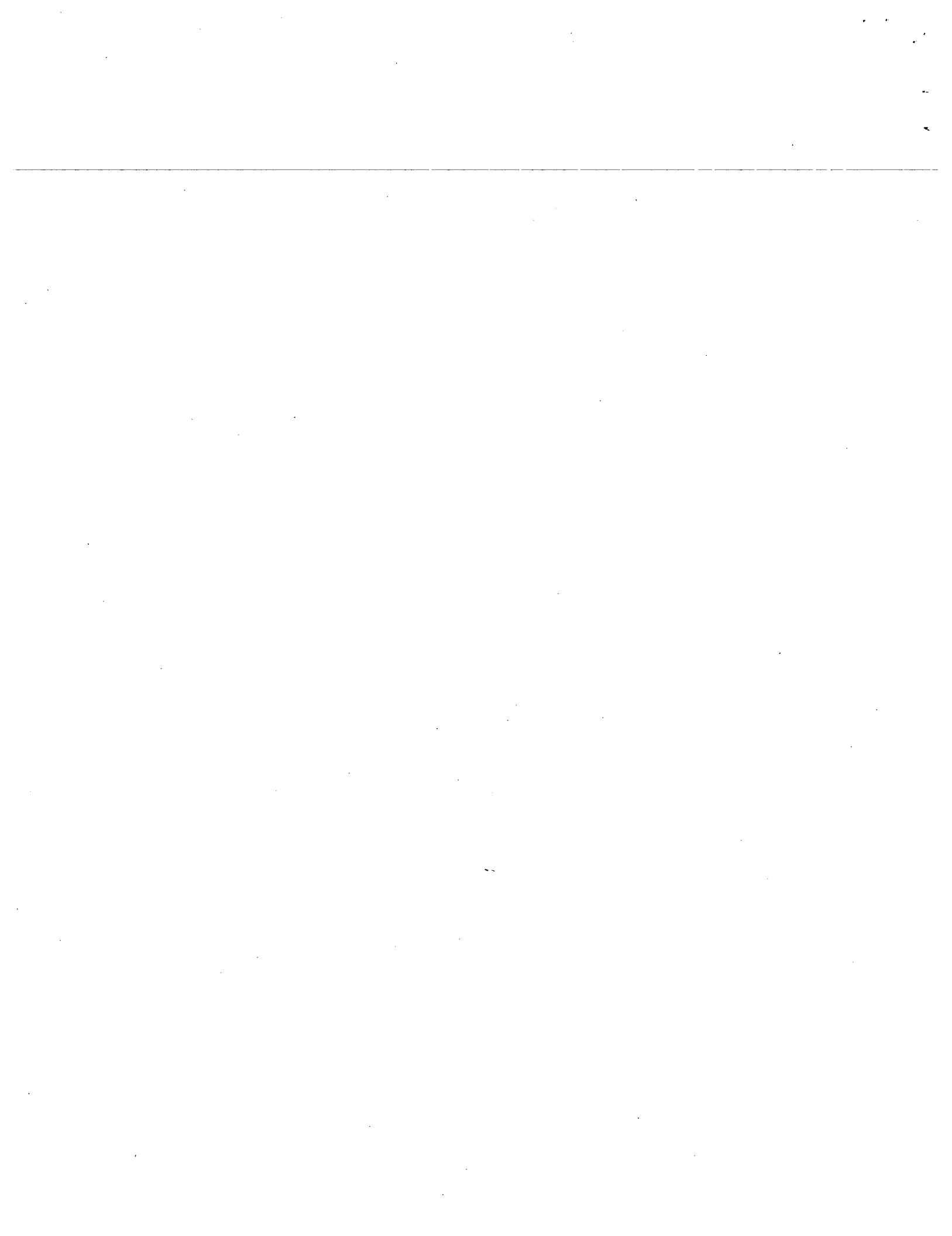


図2. p24 アミノ酸配列の親水性パターンと合成したペプチドの部位 (No. 9~13)



Polypeptides for detecting the antibodies to Borna disease virus

[ABSTRACT]

[Object]

Antigen peptides with high specificity for measurement of anti-BDV antibodies, a method for measuring the same, and an assay reagent therefor.

[Solving Means]

Polypeptides having the sequences of 3 to 20, 48 to 68, 310 to 323, and 338 to 358 in the amino acid sequence of BDV nucleoprotein (p40), and polypeptides having the sequences of 41 to 55 and 59 to 79 in the amino acid sequence of the polymerase cofactor (p24) are useful for detecting anti-BDV antibodies, since they immunoreact with the antibodies specifically.

[What is claimed is:]

[1]

Polypeptides constituting the nucleoprotein (p40) or the polymerase cofactor (p24) of Borna disease virus, having the amino acid sequences represented by Sequence Nos. 1 to 6, or polypeptides practically the same as said polypeptides.

[2]

A method for detecting anti-Borna disease virus antibodies by detecting antibodies to polypeptides constituting the nucleoprotein (p40) and/or the polymerase cofactor (p24) of Borna disease virus in biological samples, comprising the steps of: (a) mixing a biological sample and at least one of polypeptides containing the amino acid sequences represented by Sequence ID Nos: 1 to 6 or polypeptides practically the same as said polypeptides to generate immunoreacted products; (b) labeling said immunoreacted products; and (c) determining the amount of the labeled products.

[3]

An assay reagent for detecting Borna disease virus antibodies, characterized by having at least one polypeptide selected from polypeptides constituting the nucleoprotein (p40) or the polymerase cofactor (p24) of Borna disease virus and having the amino acid sequences represented by Sequence ID Nos: 1 to 6 or polypeptides practically the same as said

polypeptides.

[DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION]

[0001]

[FIELD OF THE INVENTION]

The present invention relates to a diagnostic reagent for diagnosing infection diseases of human and other animals, and in particular, to peptides for detecting the antibodies to Borna disease virus, a method for detecting the same, and a reagent to be used in detecting the same.

[0002]

[BACKGROUND OF THE INVENTION]

Borna disease is a viral encephalomyelitis found in horses in Germany and the neighboring countries throughout the year. It causes symptoms such as cerebral palsy and emotional disturbance and can be lethal if it is acute. The lesions are frequently found in the nuclei of nerve cells in brain stem, especially in mid brain, and inclusion bodies called Joest-Degen bodies are formed in such nerve cell nuclei. The Borna disease virus (hereinafter, referred to as BDV) is a virus in the Bornaviridae family, which is known to be a negative-strand RNA virus having a single chain genome of about 9 kb in length. In addition to horses, sheep, cows, cats, ostriches, and others are naturally infected with BDV, and a very wide range of animals from mouse to birds and monkeys can also be transmitted with this virus experimentally. Serological tests revealed that there are some people who have antibodies to BDV (Rott, R. et al., Science, 228, 755-756, 1985), and it was reported that the number of the carriers is higher in the patients of nervous and mental diseases such as schizophrenia, depression, and the like than in the healthy people, herewith the virus has been brought to attention. The complete base sequence of the virus was already reported by Cubitt et al. (Cubitt, B., et al., J. Virol., 68, 1382-1396, 1994) and by Briese et al. (Briese, T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 4362-4366, 1994). Proteins such as nucleoprotein (p40), polymerase cofactor (p24), matrix (gp18), envelope (gp56), and polymerase (p180) are known to be coded by the viral gene. For diagnosis of BDV infection, the serological methods of detecting anti-BDV antibodies in blood and the genetic methods of directly detecting the BDV

genomic RNAs by the RT-PCR method are commonly practiced. As the method for detecting the anti-BDV antibodies, commonly used are: indirect fluorescent antibody method (Amsterdam, J. D., et al., Arch. Gen. Psychiatry, 42, 1093-1096, 1985); western blotting method (Fu, Z. F., et al., J. Affect. Disord., 27, 61-68, 1993); immunoprecipitation method (Bode, L. et al., J. Med. Virol., 36, 309-315, 1992); ELISA method (Weisman, Y., et al., Lancet, 344, 1232-1233, 1994); and flow cytometric method of analyzing monocytes in patients' peripheral bloods (Bode, L. et al., Nature Medicine, 1, 232-236, 1995); and the like. Although there are many methods of detecting the antibodies as described above, the standard method higher in reliability for analyzing the antibodies is yet to be established, because it is difficult to distinguish specific and nonspecific reactions due to generally extremely low titer of the anti-BDV antibodies in human and also the different results depending on the antigens used. For direct detection of the BDV genomic RNAs, a method of detecting the viral gene fragments in monocytes in human peripheral blood by the RT-PCR method is disclosed (Kishi, M., et al., FEBS Lett., 364, 293-297, 1995). Although the method of directly detecting genomes is reliable, BDV is a neurotropic virus in itself and thus BDV genomic RNAs are not always detected in the peripheral bloods monocytes of the patients. In addition, as extremely high in sensitivity, the RT-PCR method is always accompanied by the danger of false-positive reactions due to cross contamination, and accordingly there are not much reliable and general data accumulated yet.

[0003]

[PROBLEM TO BE SOLVED BY THE INVENTION]

An object of the present invention is to provide an antigen peptide having a high specificity to anti-BDV antibodies in detecting the same, and a method for measuring the same and an assay reagent therefor.

[0004]

[SUMMARY OF THE INVENTION]

After a study focusing on the peptides constituting the nucleoprotein (p40) and polymerase cofactor (p24) of BDV, the present inventors have found that polypeptides having partial sequences of 3 to 20, 48 to 68, 310 to 323 and 338 to 358 in the amino acid sequence of p40 and polypeptides having partial the amino acid sequences represented by sequence of 41 to 55 and 59 to 79 in the amino acid sequence of p24 specifically

immunoreact with the antiserums to BDV, and completed the present invention. The present invention provides (1) nucleic acid sequence coding polypeptides constituting the nucleoprotein (p40) or the polymerase cofactor (p24) of Borna disease virus, having amino acid sequences represented by Sequence ID Nos: 1 to 6, or polypeptides practically the same as said polypeptides; (2) a method for detecting Borna disease virus antibodies, using the polypeptide as an antigen; and (3) an assay reagent for detecting Borna disease virus antibody containing the polypeptides as a constituents. In addition, polypeptides practically the same as the polypeptides according to the present invention having the amino acid sequences represented by Sequence ID Nos: 1 to 6 are also included in the present invention. The term "polypeptides practically the same as the polypeptides according to the invention" means that those peptides have a certain binding potential to Borna disease virus antibody, and examples thereof include peptides wherein one or more amino acids are deleted, substituted or added.

[0005]

[DESCRIPTION OF PREFERRED EMBODIMENTS]

Hereinafter, the present invention will be described in detail. By using the peptides according to the present invention, it is determined by an immunological method whether or not the anti-BDV p40 and/or p24 antibodies is/are present in biological samples and thus diagnosis of infection to the virus. Examples of the biological samples include serum, plasma, spinal fluid, lymph fluid, saliva, serous fluid, cells and the like of human and animals. Any methods known in the art may be used as the immunological method, and examples thereof include electrochemical luminescent immunoassay, enzyme immunoassay, radioimmunoassay, western blotting method, passive particle agglutination method, passive hemagglutination method, latex agglutination method, chemiluminescent immunoassay, and the like. Hereinafter, the present invention will be described using the electrochemical luminescent immunoassay as an example. The measurement system consists of a carrier whereto an antigen peptide is immobilized, a test sample, an antibody for labeling, an electrochemically light-emitting material as the labeling material, and the like. The methods for preparing the antigen peptides include, but are not particularly limited to, common chemical synthesis, extraction from the cells infected with BDV, expression in genetically modified microbes such as *E. coli*, and the like, but the methods by chemical synthesis is preferable since they provide peptides higher in specificity. The

chemical synthesis methods include, for example, solid-phase synthesis and the like. One or more amino acid residues such as cysteine and lysine may be added to the end of the peptides according to the present invention to facilitate adsorption of the peptides onto the carrier used in the measurement system. Any one of the carriers, including magnetically sensitive particle, microtiter plate, plastic bead, erythrocyte, gelatin particle, polyamino acid particle, latex particle, nylon membrane, nitrocellulose membrane and the like, may be used as the carrier for immobilization of the peptides, and a suitable carrier may be selected according to the desired measuring method to be employed. Magnetic particles, latex particles or the like are preferably used in the electrochemical luminescent assay. Human IgG, IgM, and IgA antibodies are used as the antibody for labeling. Examples of the electrochemically light-emitting materials to be used as the labeling material include tris(bipyridyl)ruthenium, tris(bipyridyl)osmium, tris(bipyridyl)cadmium, tris(bipyridyl)rhenium, and the like. Measurement is performed according to the following procedure. An antigen peptide is immobilized on the magnetically sensitive particles, and the resulting particles are allowed to react with a test sample. After washing, the particles are reacted with an anti-human IgG antibody labeled with an electrochemically light-emitting material. After additional washing, an electric energy is applied to the magnetically sensitive particles, and the amount of light emission from the electrochemically light-emitting material is determined. The assay reagents according to the present invention have at least one polypeptide selected from those represented by the Sequence ID Nos: 1 to 6 as the essential component, and additionally contain an antibody for labeling, a standard antigen, enzymes and substrates, and the like. When present in an assay system at the same time, the peptide and the electrochemically light-emitting material may be present in the form wherein they are bound to each other. The assay reagents may additionally contain a suitable antigen-diluting solution, a reaction system-diluting solution, a washing solution, a luminescence-assisting solution, or the like.

[0006]

The recombinant BDV p40 and p24 antigen proteins used in the present invention may be prepared by the conventional gene modification methods. For example, a p40 cDNA corresponding to one of the antigen proteins above (Cubitt, B., et al., J. Virol., 68, 1382-1396, 1994) is inserted into a plasmid. Examples of the plasmid vectors into which

the cDNA is incorporated include pBluescript II SK, pBR322 and pUC18 derived from *E. coli*, psH15 derived from *Bacillus subtilis* and the like, but any plasmid vectors may be used as long as it can be incorporated into, and reproduced and amplified in host cell. The vectors obtained in this manner are introduced into a suitable host, for example, *E. coli* or the like, to prepare a transformant. Examples of the methods of introducing the vector into a host include competent cell method (J. Mol. Biol., 53, 154, 1970), protoplast method (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929, 1978), calcium phosphate method (Science, 221, 551, 1983), in vitro packaging method (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 581, 1975), virus vector method (Cell, 37, 1053, 1984), and the like. Examples of *E. coli* used as the host include *Escherichia coli* HB101, JM109, and the like. If the vector carrying the cDNA is a plasmid, the plasmid may be incorporated into host cells by calcium chloride method or calcium chloride-rubidium chloride method (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, p249, 1982). In this manner, after these transformants are proliferated by the usual culture methods, the p40 antigen proteins are extracted from the culture (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982).

[0007]

[EXAMPLES]

Hereinafter, the present invention will be described in more detail with reference to EXAMPLES, but it should be understood that the present invention is not limited thereto.

EXAMPLE 1 Preparation of BDV synthetic peptides

On the basis of the amino acid sequences of the nucleoprotein (p40) and polymerase cofactor (p24) portions of BDV reported by Cubitt et al. (Cubitt, B., et al., J. Virol., 68, 1382-1396, 1994), 13 fragments with high hydrophilicity were selected using the Hopp-Woods method (Hopp, T. P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 3824-3828, 1981)(Figures 1 and 2). For each amino acid sequence, the corresponding peptide was prepared by solid-phase synthesis and purified by reversed phase liquid chromatography so as to give a purity of 95% or more.

[0008]

EXAMPLE 2 Screening of the BDV synthetic peptides

A recombinant BDV p40 or p24 antigen was injected into rabbits, and anti-BDV p40

serum and anti-BDV P24 serum are prepared respectively from the rabbits. Normal rabbit serum was used as a control. The 13 kinds of peptides prepared in EXAMPLE 1 were dissolved respectively in 0.05 M borate buffer solution (pH 9.5) so as to give a concentration of 100 µg/ml. To 1 ml of each peptide solution, 30 mg of magnetically sensitive beads (Dynabeads M-450TM, manufactured by Dynal Biotech) was added, and the mixture was stirred at 37°C overnight, to give each of the 13 kinds of peptide-bound beads. 200 µl of chicken serum, 20 µl of the rabbit antiserum, and 25 µl of each peptide-bound beads (1 mg/ml) were placed in a reaction tube, and the mixture was reacted at 30°C for 9 minutes. After the beads were washed, 200 µl of an anti-rabbit IgG antibody solution (1 µg/ml) labeled with a ruthenium complex was added and the mixture was reacted at 30°C for 9 minutes. After the beads were washed once again, 250 µl of an electrolyte for light emission was added to the reaction tube. The amounts of light emission from the ruthenium complex trapped on the beads when an electric energy is applied were determined by a luminescence detector (Picolumi 8220TM, manufactured by Sanko Junyaku Co. Ltd.). The results revealed that the peptides of Nos. 1, 2, 7 and 8 reacted specifically with the anti-BDV p40 rabbit serum and the peptides of Nos. 10 and 11 specifically with the anti-BDV p24 rabbit serum (Tables 1 and 2). The amino acid sequences of these peptides are shown below as Sequence ID Nos: 1 (No.1), 2 (No.2), 3 (No.7), 4 (No.8), 5 (No.10), and 6 (No.11), respectively.

[0009]

[Table 1]

Table 1. Reactivity between various p40 peptides and the anti-p40 rabbit serum

Sequence ID No:	Amino acid sequence	ECLIA count	
		Normal rabbit serum	Anti-p40 rabbit serum
1	3 - 20	253	266,239
2	48 - 68	423	116,369
3	119 - 132	379	9,592
4	152 - 167	165	1,014
5	214 - 226	202	561
6	261 - 277	291	1,861
7	310 - 323	275	49,038
8	338 - 358	109	236,197

[0010]

[Table 2]

Table 2. Reactivity between various p24 peptides and the anti-p24 rabbit serum

Sequence ID No:	Amino acid sequence	ECLIA count	
		Normal rabbit serum	Anti-p24 rabbit serum
9	11 - 35	264	736
10	41 - 55	166	35,288
11	59 - 79	182	78,833
12	82 - 97	257	1,286
13	140 - 160	223	871

[0011]

Type of sequence: Amino acid

[Sequence Table]

Topology: Linear chain

Sequence ID No: 1

40 Kind of sequence: Peptide

Length of sequence: 18

Sequence

Pro Lys Arg Arg Leu Val Asp Asp Ala Asp Ala Met Glu Asp Gln Asp

1

5

10

15

Leu Tyr

[0012] Sequence ID No 2

Topology: Linear chain

Length of sequence: 21

Kind of sequence: Peptide

Type of sequence: Amino acid

Sequence

Gly His Glu Lys Asp Ile Arg Gln Asn Ala Val Ala Leu Leu Asp Gln

1

5

10

15

Ser Arg Arg Asp Met

20

[0013] Sequence ID No: 3

Topology: Linear chain

Length of sequence: 14

Kind of sequence: Peptide

Type of sequence: Amino acid

Sequence

Ser Lys Lys Glu Asn Pro Thr Met Ala Gly Tyr Arg Ala Ser

1

5

10

[0014] Sequence ID No: 4

10 Topology: Linear chain

Length of sequence: 20

Kind of sequence: Peptide

Type of sequence: Amino acid

Sequence

Arg Tyr Arg Arg Arg Glu Ile Ser Arg Gly Glu Asp Gly Ala Glu Leu

1

5

10

15

Ser Gly Glu Ile

20

[0015] Sequence ID No: 5

Topology: Linear chain

Length of sequence: 15

Kind of sequence: Peptide

Type of sequence: Amino acid

20

Sequence

Gln Pro Val Asp Gln Leu Leu Lys Asp Leu Arg Lys Asn Pro Ser

1

5

10

15

[0016] Sequence ID No: 6

Topology: Linear chain

Length of sequence: 21

Kind of sequence: Peptide

Type of sequence: Amino acid

Sequence

Asp Pro Asp Gln Arg Thr Gly Arg Glu Gln Leu Ser Asn Asp Glu Leu

1

5

10

15

Ile Lys Lys Leu Val

20

[0017]

[BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS]

Figure 1 is a chart illustrating the hydrophilicity pattern of the amino acid sequence of the nucleoprotein (p40) of BDV and the regions of the synthetic peptides.

Figure 2 is a chart illustrating the hydrophilicity pattern of the amino acid sequence of the polymerase cofactor (p24) of BDV and the regions of the synthetic peptides.

[Figure 1]

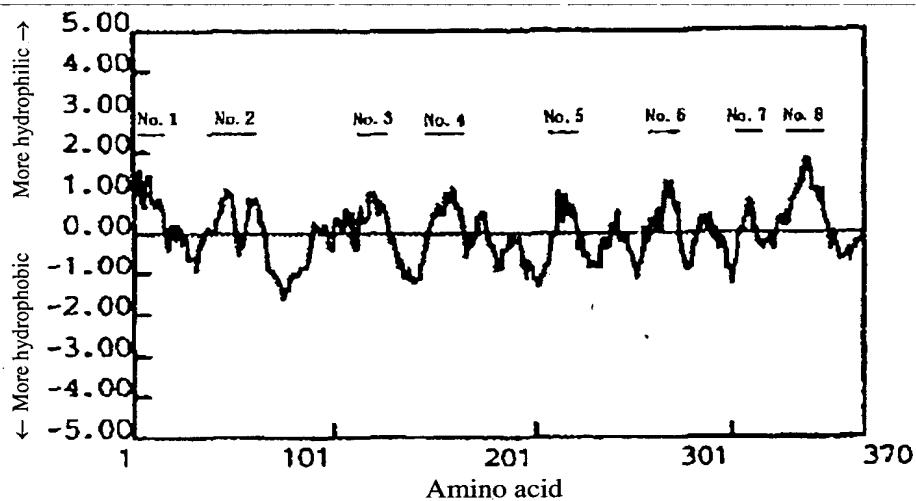


Figure 1. Hydrophilicity pattern of P40 amino acid sequence and the regions of the synthetic peptides (Nos. 1 to 8).

[Figure 2]

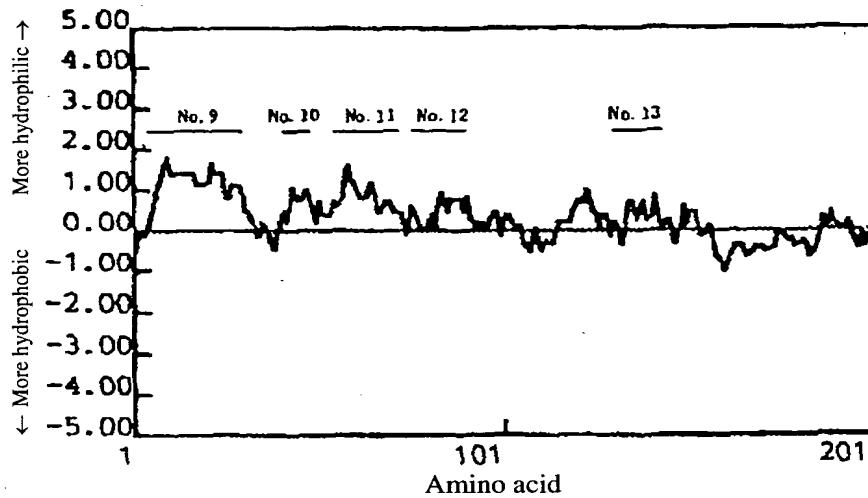


Figure 2. Hydrophilicity pattern of P24 amino acid sequence and the regions of the synthetic peptides (Nos. 9 to 13)